

INFECTION EXPERIMENTALE DE VEAUX PAR LE VIRUS DE LA FIEVRE CATARRHALE OVINE DE SEROTYPE 8 *

Fabiana Dal Pozzo^{1,2}, Kris De Clercq³, Hugues Guyot⁴, Elise Vandemeulebroucke³,
Pierre Sarradin⁵, Frank Vandebussche³, Etienne Thiry² et Claude Saegerman¹

RESUME

Le sérotype 8 du virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV-8), identifié pour la première fois au Nord de l'Europe en août 2006, a été la cause de signes cliniques sévères et de troubles de la reproduction chez les bovins. L'étude de la pathogénie du BTV-8 chez les bovins nécessite l'obtention d'un modèle animal expérimental qui puisse reproduire les manifestations cliniques observées sur le terrain.

Mots-clés : Epidémiologie clinique, fièvre catarrhale ovine, infection expérimentale, signes cliniques, bovins, veaux.

SUMMARY

Bluetongue virus serotype 8 (BTV-8) was identified for the first time in Northern Europe in August 2006. Infected cattle showed severe clinical signs and reproductive disorders. The study of BTV-8 pathogenesis in cattle requires the development of an experimental model reproducing the clinical signs observed in the field.

Keywords : Clinical epidemiology, Bluetongue, Experimental infection, Clinical signs, Bovine, Calves.



* Texte de la communication affichée au cours des Journées scientifiques AEEMA-AESA, 4-5 juin 2009

¹ Epidémiologie et analyse de risques appliquées aux sciences vétérinaires, Département des maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

² Virologie et pathologie des maladies virales, Département des maladies infectieuses et parasitaires, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

³ Centre d'étude et de recherche vétérinaires et agrochimiques, Département de virologie, Groeselenberg 99, 1180 Bruxelles, Belgique

⁴ Clinique des animaux de production, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

⁵ INRA UE 1277, Plate-forme d'infectiologie expérimentale, 37380 Nouzilly, France

I - INTRODUCTION

La fièvre catarrhale ovine (FCO) est une maladie à transmission vectorielle, non contagieuse, causée par un virus du genre *Orbivirus* appartenant à la famille des *Reoviridae*. Le virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV) est formé de deux capsides enfermant un cœur consistant en 10 segments d'ARN bicaténaire qui codent pour 7 protéines structurales (VP1 à VP7) et quatre protéines non structurales (NS1 à NS3, NS3A) [Mertens *et al.*, 2005]. La capside externe est formée par les protéines VP5 et VP2, responsables de la spécificité du sérotype. VP2 est la protéine dotée de la plus grande variabilité et contient les épitopes qui interagissent avec les anticorps neutralisants pour déterminer le sérotype viral [Huismans et Erasmus, 1981; Maan *et al.*, 2007]. La protéine VP7 est l'antigène spécifique de groupe et est bien conservée entre les différents sérotypes du virus de la FCO [Huismans et Erasmus, 1981]. Il existe dans le monde 24 sérotypes connus de ce virus et récemment on a soupçonné l'identification d'un possible 25ème sérotype en Suisse [Hofmann *et al.*, 2008]. Plusieurs sérotypes ont été identifiés en Europe méditerranéenne à partir de 1998 [Saegerman *et al.*, 2008]. Le sérotype 8 (BTV-8) a été identifié pour la première fois au Nord de l'Europe en août 2006.

Le virus de la FCO peut infecter un large spectre de ruminants domestiques et sauvages. La pathogénie du BTV est comparable chez les ovins et les bovins [MacLachlan, 1994]. Cependant, des signes cliniques sévères ont été seulement observés chez certaines races de moutons (dites « améliorées ») et chez un nombre restreint de cervidés. Les bovins et les chèvres sont habituellement atteints d'infections subcliniques, et peuvent servir de réservoirs viraux pour les moutons. Toutefois, le taux de morbidité associé au BTV-8 chez les bovins en Europe a été très élevé, se traduisant par des signes cliniques sévères et des troubles de la reproduction [Guyot *et al.*, 2008]. L'étude de la pathogénie du BTV-8 chez les bovins nécessite un modèle animal qui puisse reproduire les manifestations cliniques observées sur le terrain. Une étude conduite avec des moutons et des bovins après infection expérimentale avec le BTV-8 a reproduit des lésions dans les organes lymphoïdes de bovins infectés sans toutefois présenter de signes cliniques sévères [Darpel *et al.*, 2007].

Le but de cette étude était d'établir un modèle expérimental qui puisse reproduire les signes cliniques chez des veaux infectés avec le BTV-8.

II - MATERIELS ET METHODES

1. CHOIX DES VEAUX ET DU VIRUS

Deux veaux pie-noire de cinq mois ont été utilisés dans cette étude (veau 3179 et 3181). Les animaux ont été achetés dans une exploitation française indemne de FCO, et ils ont été testés pour confirmer l'absence de virémie et de séroconversion pour le virus de la FCO, le virus de la diarrhée virale bovine et le virus de la rhinotrachéite infectieuse bovine.

La souche virale BEL2006/01 P2, isolée au laboratoire sur œufs embryonnés de poule et passée deux fois sur cellules BHK-21 (faible nombre de passages cellulaires), a été utilisée comme inoculum.

2. INFECTION EXPERIMENTALE

L'infection expérimentale s'est déroulée pendant l'hiver, dans une plate-forme de biosécurité de niveau 3. Les veaux ont été infectés conjointement avec 1 ml d'inoculum ($10^{5.3}$ TCID₅₀/ml) par voie intraveineuse et 1 ml d'inoculum ($10^{6.3}$ TCID₅₀/ml) par voie sous-cutanée.

3. SUIVI CLINIQUE DES ANIMAUX

Les veaux ont été examinés tous les jours par un vétérinaire et un formulaire d'évaluation clinique standardisé pour la FCO a été utilisé pour la détection des signes cliniques présentés par les animaux [Saegerman *et al.*, 2008].

Ce formulaire standardisé concerne différents groupes de signes cliniques tels que les signes généraux, les signes digestifs, les signes cutanés, les signes locomoteurs et les signes respiratoires [Saegerman *et al.*, 2008]. En présence d'un signe clinique, sa sévérité a été quantifiée avec l'attribution d'une note de 0 à 3. Une note clinique journalière et une note clinique globale par catégorie de signes cliniques ont été attribuées pour chaque animal.

4. ANALYSES DE LABORATOIRE

Afin de déterminer la cinétique d'apparition de la virémie et de la réponse humorale, des prélèvements sanguins journaliers ont été réalisés. Un test ELISA de compétition et commercial a été utilisé pour détecter les anticorps dirigés contre la protéine structurale

VP7 du virus de la FCO (ID VET, Montpellier, France). Les prélèvements sanguins avec EDTA ont été utilisés pour la détection de l'ARN viral à l'aide d'une RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) en temps réel ayant pour cible le segment 5 du virus de la FCO [Toussaint *et al.*, 2007]. Les valeurs seuils⁶ (Ct) ont été utilisées pour comparer les taux sanguins journaliers d'ARN viral pour chaque veau.

5. ANALYSE STATISTIQUE

Un coefficient de corrélation des rangs de Spearman [Dagnelie, 1998] a été utilisé pour l'analyse statistique des scores cliniques attribués aux veaux pendant la durée de l'expérience (r_s). Une différence a été considérée significative pour une valeur de $P < 0,05$.

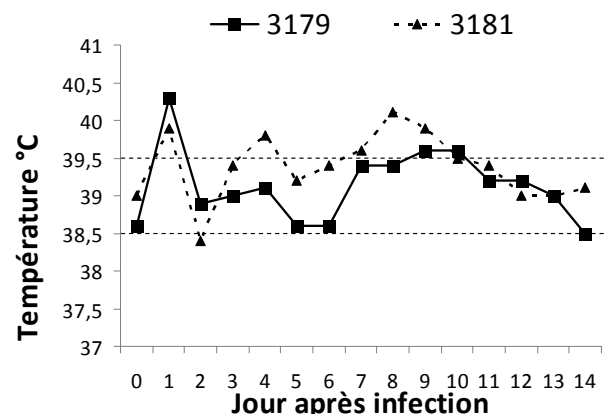
III - RESULTATS

1. EXAMEN ET PROFIL CLINIQUES

Les veaux ont montré des signes cliniques très similaires aux manifestations de la maladie observées dans les cas spontanés de FCO. Des variations de la température par rapport aux variations physiologiques normales (entre

38,5°C et 39,5°C) ont été enregistrées pour les veaux. Une première hyperthermie fugace (un jour) après l'infection et une deuxième hyperthermie associée à l'augmentation de la virémie d'une durée de deux à trois jours ont été mesurées (figure 1).

Figure 1
Variations de la température corporelle des veaux
après l'infection expérimentale avec BTv-8



⁶ Une mesure de fluorescence est obtenue et permet de donner une valeur numérique (Ct) définissant le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un niveau défini de fluorescence relative permettant la détection du signal. Ce Ct renseigne sur le processus d'amplification permettant la comparaison de différents échantillons afin d'établir les résultats définitifs.

Les signes cliniques les plus précoces (deux à trois jours après l'infection) ont été observés aux niveaux buccal et oculaire. Après la congestion des gencives, des ulcères buccaux sont apparus quatre et onze jours après l'infection. Au niveau oculaire, un larmolement initialement séreux s'est aggravé par une conjonctivite et un jetage muco-purulent. Six jours après l'infection, un gonflement sous-maxillaire a été constaté chez les veaux. Un

érythème péri-coronaire a été observé une semaine après l'infection, accompagné ensuite d'œdème du boulet et du paturon. Le suivi des notes cliniques assignées au cours de l'expérience a montré que l'infection est devenue progressivement évidente après une période de trois jours d'incubation, avec une exacerbation des manifestations cliniques une semaine après l'infection (tableau 1).

Tableau 1

Notes cliniques attribuées par jour et par veau selon un formulaire d'évaluation clinique standardisé pour la fièvre catarrhale ovine

Animal	Jour après infection															Total des notes
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
HYPERTHERMIE																
3179	0	2	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	4
3181	0	1	0	0	1	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	6
LESIONS OCULAIRES																
3179	0	1	1	2	2	2	1	1	1	0	0	0	1	2	1	15
3181	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	2	2	0	0	0	10
LESIONS BUCCALES																
3179	0	0	0	0	3	3	3	3	3	1	3	3	3	3	3	31
3181	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	3	3	3	3	18
LESIONS PODALES																
3179	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	17
3181	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	2	2	13
OEDEMES																
3179	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
3181	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	9
SOMME DES NOTES CLINIQUES PAR JOUR																
3179	0	3	1	2	5	6	6	6	7	5	7	6	7	8	7	76
3181	0	1	0	0	2	2	3	5	6	5	6	8	6	6	6	56

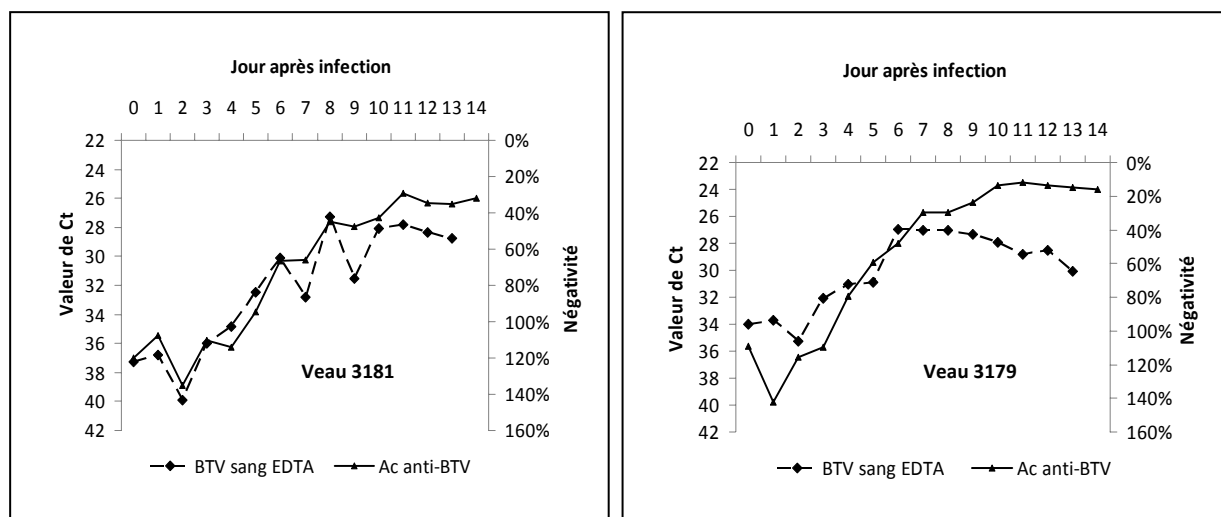
Légende: L'attribution des notes cliniques a été réalisée selon les critères suivants : hyperthermie (0 si la température $\leq 39,5^{\circ}\text{C}$; 1 si la température $\geq 39,6^{\circ}\text{C} \leq 39,9^{\circ}\text{C}$; 2 si la température $\geq 40^{\circ}\text{C} < 41^{\circ}\text{C}$; 3 si la température $> 41^{\circ}\text{C}$) ; lésions oculaires (0 en absence de signes ; 1 si larmolement oculaire ; 2 si larmolement oculaire et conjonctivite ; 3 si dermatite oculaire) ; lésions buccales (0 en absence de signes ; 1 si congestion buccale ; 2 en présence d'une érosion ou d'un ulcère ; 3 si des lésions multiples). Une note de 1 a été attribuée à la présence d'une croûte liée à la régression d'une lésion aigue. Lésions podales (0 en absence de signes ; 1 si congestion péri-coronaire ; 2 si présence d'un œdème et de congestion ; 3 si présence de boiteries) ; Œdèmes (0 en absence de œdèmes ; 1 si un œdème ; 2 si 2 œdèmes ; 3 à la présence de plusieurs œdèmes). Une note récapitulative pour chaque groupe de signes cliniques a été calculée et correspond à la somme des notes enregistrées pendant la durée de l'expérience. Une note clinique globale a été calculée et correspond à la somme des différentes notes journalières de chaque veau.

L'analyse statistique a montré une très bonne corrélation entre la note journalière des veaux ($r_s = 0.86$) et les notes attribuées à chaque groupe de signes cliniques chez les deux veaux ($r_s = 1$) (avec $P < 0.0001$). Cette analyse indique la présence d'un profil clinique très similaire entre les deux veaux infectés.

2. ANALYSES DE LABORATOIRE

La virémie, quantifiée par la détection de l'ARN génomique viral, déjà mesurable le premier jour après l'infection, a subi une augmentation progressive à partir du quatrième jour après l'infection (figure 2). Une séroconversion a également été démontrée entre les jours sept et onze après l'infection (figure 2).

Figure 2
Détection de l'ARN viral (virémie) et des anticorps anti-sérogroupe



Légende : Un profil commun de détection de l'ARN viral a été observé dans le sang de deux veaux infectés. Entre les jours 7 et 9 après infection, un pic de virémie a été enregistré, qui a été suivi par un plateau et une décroissance progressive de l'ARN viral. Les anticorps anti-VP7 ont été mesurés déjà très précocement à partir du jour 4 après infection.

IV - CONCLUSIONS

Cette étude préliminaire montre pour la première fois le développement de signes cliniques sévères chez des veaux infectés expérimentalement avec le BTV-8. Dans le chapitre dédié à la fièvre catarrhale ovine, l'Organisation mondiale de la santé animale (*Office international des Epizooties*) recommande, pour l'infection d'animaux, l'utilisation d'un virus sauvage et non obtenu par passages cellulaires afin d'obtenir des signes cliniques de la maladie. Les veaux utilisés dans cette étude ont été infectés conjointement par voie intraveineuse et par

voie sous-cutanée avec une souche de BTV-8 à titre élevé et passée deux fois sur cellules BHK-21. On suppose que l'injection intraveineuse d'un virus virulent a été à l'origine de la reproduction de signes cliniques très similaires à ceux observés naturellement. Récemment des manifestations sévères de FCO ont été décrites après infection intraveineuse de moutons avec le BTV-4 [MacLachlan *et al.*, 2008].

La présence de signes cliniques et de troubles de la reproduction chez les bovins naturellement infectés par le BTV-8 sont des

aspects atypiques dans la pathogénie classique du virus de la fièvre catarrhale ovine. Le présent modèle expérimental peut être utilisé dans l'étude de la pathogénie de

l'infection du BTV-8 chez les bovins, afin de mieux définir les caractéristiques de virulence de la souche virale impliquée dans l'épizootie de FCO à sérotype 8 en Europe.

BIBLIOGRAPHIE

- Dagnelie P. - Interférence statistique à une et à deux dimensions. *In*: Statistique théorique et appliquée. Volume 2. De Boeck and Larcier (Eds.), Paris, 1998.
- Darpe K.E., Batten C.A., Veronesi E., Shaw A.E., Anthony S., Bachanek-Bankowska K., Kgosana L., bin-Tarif A., Carpenter S., Müller-Doblies U.U., Takamatsu H.H., Mellor P.S., Mertens P.P., Oura C.A. - Clinical signs and pathology shown by British sheep and cattle infected with bluetongue virus serotype 8 derived from the 2006 outbreak in northern Europe. *Vet. Rec.*, 2007, **161**, 253-261.
- Guyot H., Mauroy A., Kirschvink N., Rollin F., Saegerman C. - Clinical aspects of bluetongue in ruminants. *In*: Bluetongue in northern Europe. Saegerman C., Reviriego-Gordejo F., Pastoret P.P. (Eds.), OIE publication, Paris, France, 2008, 34-52.
- Hofmann M.A., Renzullo S., Mader M., Chaignat V., Worwa G., Thuer B. - Genetic characterization of toggenburg orbivirus, a new bluetongue virus, from goats, Switzerland. *Emerging Infect. Dis.*, 2008, **14**, 1855-1861.
- Huismans H., Erasmus B.J. - Identification of the serotype-specific and group-specific antigens of bluetongue virus. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 1981, **48**, 51-58.
- Maan S., Maan N.S., Samuel A.R., Rao S., Attoui H., Mertens P.P. - Analysis and phylogenetic comparisons of full-length VP2 genes of the 24 bluetongue virus serotypes. *J. Gen. Virol.*, 2007, **88**, 621-630.
- MacLachlan N.J. - The pathogenesis and immunology of bluetongue virus infection of ruminants. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 1994, **17**, 197-206.
- MacLachlan N.J., Crafford J.E., Vernau W., Gardner I.A., Goddard A., Guthrie A.J., Venter E.H. - Experimental reproduction of severe bluetongue in sheep. *Vet. Pathol.*, 2008, **45**, 310-315.
- Mertens P.P.C., Maan S., Samuel A., Attoui H. - Orbivirus, Reoviridae. *In*: Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A. (Eds.), Elsevier/Academic Press, London, 2005, 466-483.
- Saegerman C., Berkvens D., Mellor P.S. - Bluetongue epidemiology in the European Union. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008a, **14**, 539-544.
- Saegerman C., Mauroy A., Guyot H. - Bluetongue in ruminants: a standardised clinical report form for the use in different species. *In*: Bluetongue in northern Europe. Saegerman C., Reviriego-Gordejo F., Pastoret P.P. (Eds.), OIE publication, Paris, 2008b, 82-87.
- Toussaint J.F., Sailleau C., Breard E., Zientara S., De Clercq K. - Bluetongue virus detection by two real-time RT-qPCRs targeting two different genomic segments. *J. Virol. Methods*, 2007, **140**, 115-123.

